

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕСТАБИЛЬНЫХ ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ ХЛАМИДОМОНАДЫ

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

*Chlamydomonas reinhardtii* - один из наиболее удобных объектов для изучения внеядерной наследственности. У этого объекта было обнаружено два типа внеядерных генов, отличающихся по наследованию. В 1954 г. Сэджер обнаружила, что мутации Sr-2 (устойчивость к 500 мг/л стрептомицина) наследуются в основном только через родителя (+) типа спаривания (Sager, 1954). Внимание исследователей было направлено на этот тип внеядерной наследственности, поскольку он имеет ряд преимуществ: были найдены эффективные мутагены для их индукции, селективные способы выявления устойчивых мутантов и их рекомбинантов, способы осуществления рекомбинационного анализа. Была построена первая генетическая карта для восьми внеядерных генов (Sager, Ramanis, 1971). Несмотря на значительные успехи в изучении этих однородительно наследуемых генов вопрос об их функции и локализации остается открытым.

Изясным биохимическим исследованием группы К.Чанга доказано физическое сохранение в ходе созревания зигот всех типов ДНК (в том числе и хлоропластных), переданных в зиготу от обоих родителей (Chiang, 1971). Исходя из этого факта, трудно согласиться с предположением о хлоропластной локализации генов, наследуемых однородительно, а если в действительности эти гены находятся в хлоропласте, то они, вероятно, связаны с малой фракцией ДНК, которая не могла выявиться в опытах Чанга. Однако эти биохимические данные указывают на перспективы изучения другого типа внеядерных, несомненно хлоропластных генов, мутации в которых должны наследоваться через обоих родителей, поскольку хлоропластная ДНК, воспроизводимая по полуконсервативному типу репликации, составляет 14% от общего количества ДНК в вегетативных клетках и 7% в гаметах. У *Chl. reinhardtii* описана предположительно внеядерная мутация типа yellow, расщепление по которой  $2Y:2Y^+$  при передаче Y от любого из родителей. Предположение о внеядерной природе этой мутации было высказано Сэджер и основано на том, что она индуцируется стрептомицином, а в скрещиваниях Y расщепляется только в первом делении мейоза и не сцеплена ни с одной из групп сцепления ядерных генов (Sager, 1962; Levine, Goodenough, 1970).

Одновременно с выявлением мутантов Y после действия стрептомицина Сэджер обнаружила нестабильные желтые мутанты (Sager, Tsubo, 1962). В скрещивании мутанта с диким типом наблюдается расщепление 2 нестаб.: 2 стаб. (Sager, Tsubo, 1962), что указывает на двуродительское наследование. Однако дальнейшего изучения этих мутантов не проводилось. Нестабильные мутанты у зеленых водорослей также были получены действием супермутагенов: В.И.Хроповой (1966) на хлорелле и Э.Е.Темпер (1971) на *Scenedesmus* действием нитрозометилмочевины и А.В.Столбовой (1971) на хламидомонаде действием нитрозоэтилмочевины (НЭМ).

В данном сообщении изложены результаты, полученные в ходе мутационного анализа, анализа педигри и гибридологического анализа нестабильных пигментных мутантов *Chl. reinhardi*.

**Материал и методы.** Исходными для нашего исследования послужили гаплоидные штаммы дикого типа(+) и (-) типов спаривания (mt (+) и mt (-)) *Chlamydomonas reinhardi* из коллекции Р.П.Левина (США). Для культивирования хламидомонады использовали различные плотные среды: минеральная I2 (Levine, Ebersold, 1958), минимальная I2 с 0,2% ацетата натрия и полная I2 с ацетатом и 1% дрожжевого автолизата.

Обработка клеток производилась в водных растворах НЭМ с концентрациями 0,05; 0,075 и 0,10%. Плотность суспензий при обработке  $1 \cdot 10^7$  -  $2 \cdot 10^7$  клеток в 1 мл воды. После 30-минутной обработки мутагеном суспензии клеток разводили водой не меньше чем в 10 раз и рассеивали по 0,05 - 0,10 мл на полную среду. Выживаемость и число мутантов учитывали через 15 дней инкубации при 25°C в темноте. Опыты проводили в трех-четыре повторностях. Чтобы отличить смешанные колонии от колоний нестабильных мутантов, производили отсев от колоний с цветными секторами. Нестабильными считали лишь те колонии, в рассеве которых сохранялась мозаичность в доле большей, чем ожидалось по расчетам вероятности повторного смешения (Квитко, 1961).

Для анализа педигри и тетрадного анализа использованы нестабильные мозаичные мутанты хламидомонады (МММ), индуцированные НЭМ в опытах А.В.Столбовой и нами: МММ-88(+), МММ-35(+), МММ-52(-), МММ-10(-) и их рекомбинанты противоположного типа спаривания. В опыте также использованы светочувствительный мутант N-13(-) и его рекомбинант противоположного типа спаривания 51-13-123(+) с изменением в локусе *lts4*, картированном А.В.Столбовой во фрагменте пока еще не идентифицированной группы сцепления (Столбова, 1971).

Процедуры скрещивания и тетрадного анализа соответствуют описанным в литературе (Ebersold, Levine, 1959; Столбова, 1971). Для определения доли мозаичных и одноцветных клонов в суспензиях гамет, использованных для получения зигот, некоторое количество гамет мутантных и диких штаммов высевали на плотные среды и по соотношению типов колоний судили о популяционном составе скрещиваемых штаммов.

Процедура изоляции клеток для анализа педигри такова же, как и при тетрадном анализе с использованием микроскопа МБС-1. Схема распределения клеток на чашке Петри представлена на рис. 1. Клетки хламидомонады в ходе одного клеточного цикла делятся чаще на 4, 8 и реже на 2 и 16 автоспор. В результате нескольких последовательных микроманипуляций можно изучить до девяти митозов в линиях отдельных потомств автоспор (рис. 1). Описание окраски колоний проводили, как и при тетрадном анализе, используя микроскоп МБС-1 при увеличении 8 x 12,5.

Проверка светочувствительности клеток осуществляется инкубацией при 2000 лк люминесцентного освещения на минимальной среде.

# I. Индукция нестабильных пигментных мутантов НЭМ

Данные по индукции нестабильных мутантов представлены в табл. I.

Спонтанный уровень встречаемости нестабильных мутантов у хламидомонады составляет 0,2 - 0,3%. Наибольшие частоты индуцированных мутантов у  $mt(+)$  и  $mt(-)$  соответственно 1,8 и 2,4%, что составляет 17-18% от всех пигментных мутантов. Изменение эффективности воздействия мутагена соответствует изменению выживаемости, причем в одном случае увеличение концентрации мутагена приводило к уменьшению мутагенного эффекта. Несмотря на большую изменчивость показателя выживаемости (коэф. варьир. от 15 до 90%) и мутабельности (коэф. варьир. от 15 до 120 для нестабильных мутантов), различия между вариантами крайних доз, а также между самой эффективной дозой и контролем достоверны.

Так как в исходном материале у хламидомонады имеются спонтанные мутанты, мы проводили опыт по реконструкции, с тем чтобы определить, в какой мере отбор мутантов может имитиро-

вать их индукцию. В четырех опытах на смесях с исходными концентрациями нестабильных мутантов 2 и 14% действие двух крайних доз мутагена увеличивает долю нестабильных мутантов в пределах 0,40 - 2,74% независимо от концентрации их в обрабатываемой популяции; таким образом, увеличение концентрации нестабильных мутантов сопоставимо с ранее наблюдавшимися частотами их индукции (табл. I).

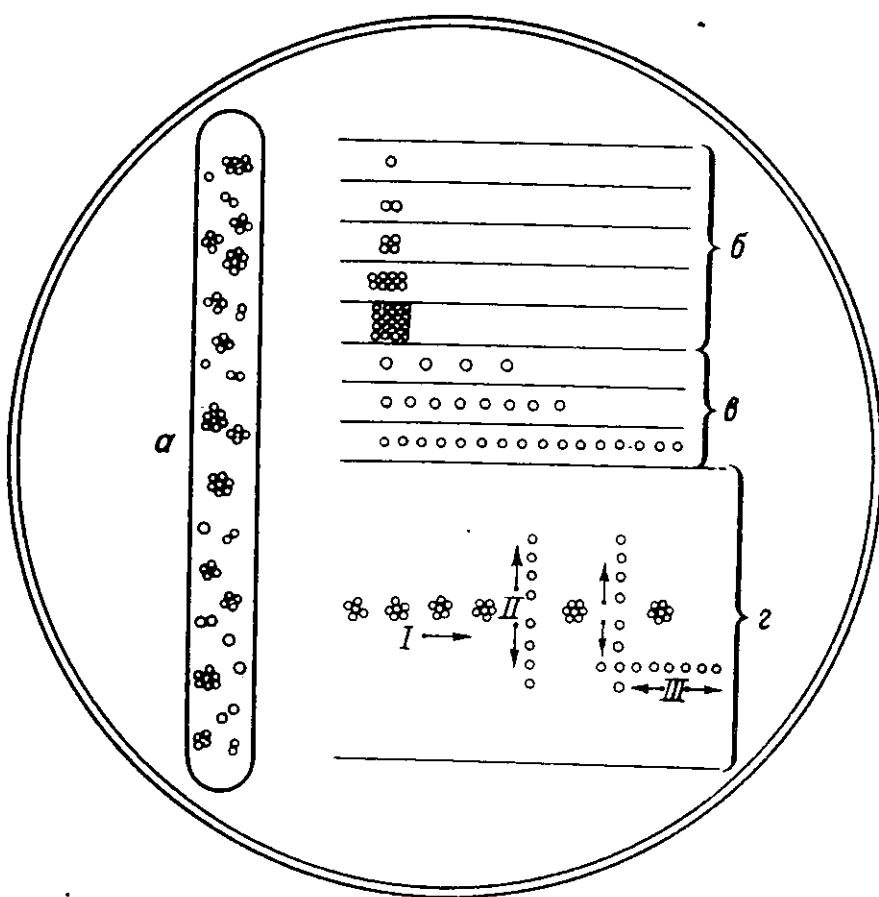


Рис. I. Схема распределения клеток на чашке Петри при анализе педигри.

a - полоса исходных клеток; б - микроколони и неподелившиеся клетки на стартовой линии (I, 2, 4, 8, 16 автоспор); в - расположение клеток после изолирования потомков из микроколоний; 2 - схема распределения клеток после нескольких последовательных микроманипуляций: I - 8 микроколоний расположенных горизонтально, - потомство, появившееся в результате трех первых митозов; II - потомство четвертого, пятого и шестого митозов; III - потомство седьмого, восьмого и девятого митозов. Стрелки указывают направления растаскивания клеток.

Т а б л и ц а I

Частоты встречаемости нестабильных пигментных мутантов, индуцированных НЭМ у хламидомонады (опыт в четырех повторностях) ( $M \pm \sigma$ )

Штамм	Концентрация мутагена, %	Число изученных колоний	Выживаемость, %	Всего пигментных мутантов, %	Нестабильные мутанты, %
mt(+)	0,00	9752	100	1,23	0,20±0,17
	0,05	16464	12,73±11,52	7,77	0,75±0,53
	0,075	8716	1,82±1,23	8,34	1,12±0,36
	0,10	14459	1,58±0,84	10,36	1,82±0,63
mt(-)	0,00	14247	100	0,35	0,28±0,34
	0,05	16183	10,57±7,09	4,48	0,52±0,40
	0,075	15849	1,66±0,63	13,03	2,35±1,04
	0,10	17222	1,20±0,17	9,01	2,21±0,33

По-видимому, действие НЭМ не приводит к отбору ранее существовавших нестабильных мутантов. И так, кроме стрептомицина, специфического внеядерного мутагена, нестабильные пигментные мутанты хламидомонады индуцируются в большом количестве НЭМ, мутагеном из группы нитрозоалкилмочевин, что совпадает с феноменами, описанными В.И.Хроповой для хлореллы, Э.Е.Темпер для сценедесмуса и Ю.Д. Белецким для пластидных мутаций у высших растений (Белецкий и др., 1969).

Для описания фенотипического разнообразия более чем у 50 нестабильных пигментных мутантов была проверена способность к росту в различных условиях питания: фототрофному (на минеральной среде), миксотрофному и гетеротрофному (на минимальной и полной средах на свету и в темноте). Все мутанты зеленеют на свету и не отличаются от диких штаммов по способности к фотосинтезу. В гетеротрофных условиях мутанты отличаются по цвету и по степени мозаицизма. Характеристика мутантов по доле желтых и зеленых сегрегантов была получена в ходе анализа родословных методом педигри (рис. 2).

## 2. Анализ митотического расщепления методом педигри

Характерная черта нестабильных мутантов – соматическое расщепление, поэтому для понимания их природы необходимо проследить наследование и расщепление разных типов клеток в ходе митотических делений. Для этого был применен метод анализа родословных (педигри), т.е. установление разнообразия типов клеток в потомстве 4, 8 или 16 клеток, образуемых после одной споруляции, что соответствует 2, 3 или 4 митозам. В некоторых случаях анализировали подряд несколько последовательных споруляций, что позволило проследить расщепление в ходе девяти митозов. На рис. 2 представлены результаты анализа педигри в виде диаграмм. Видно, что большинство потомств имеет только мозаичные колонии (класс 0:8:0). В тех случаях, когда было прослежено до девяти митозов, не удалось обнаружить чистых зеленых или желтых клонов, что свидетельствует о стабильности передачи фактора мозаичности по крайней мере через девять мито-

зов. С другой стороны, в выборке из 384 потомств 64 раза наблюдалось выщепление или зеленых, или желтых форм и лишь в одном случае обнаружили три фенотипа: 5 зел.: 2 MOM : 1 жел. Выщепление одноцветных форм, таким образом, является нерцепрокным событием и может происходить в любом из трех митозов одной споруляции. На это же указывает обнаружение всех возможных сочетаний октад из трех фенотипов по два с соотношениями от 7 зел.: 1 MOM до 1 зел.: 7 MOM и от 7 MOM : 1 жел. до 1 MOM : 7 жел. Из рис. 2 также ясно, что частоты выщепления чистых клонов неодинаковы у изученных мутантов и не зависят от типа спаривания: у мутанта MOM-52 анализ педигри дал сходные результаты на двух субклонах MOM-52-32a(-) и MOM-52-32b(+), взятых из одной тетрады и отличающихся по типу спаривания.

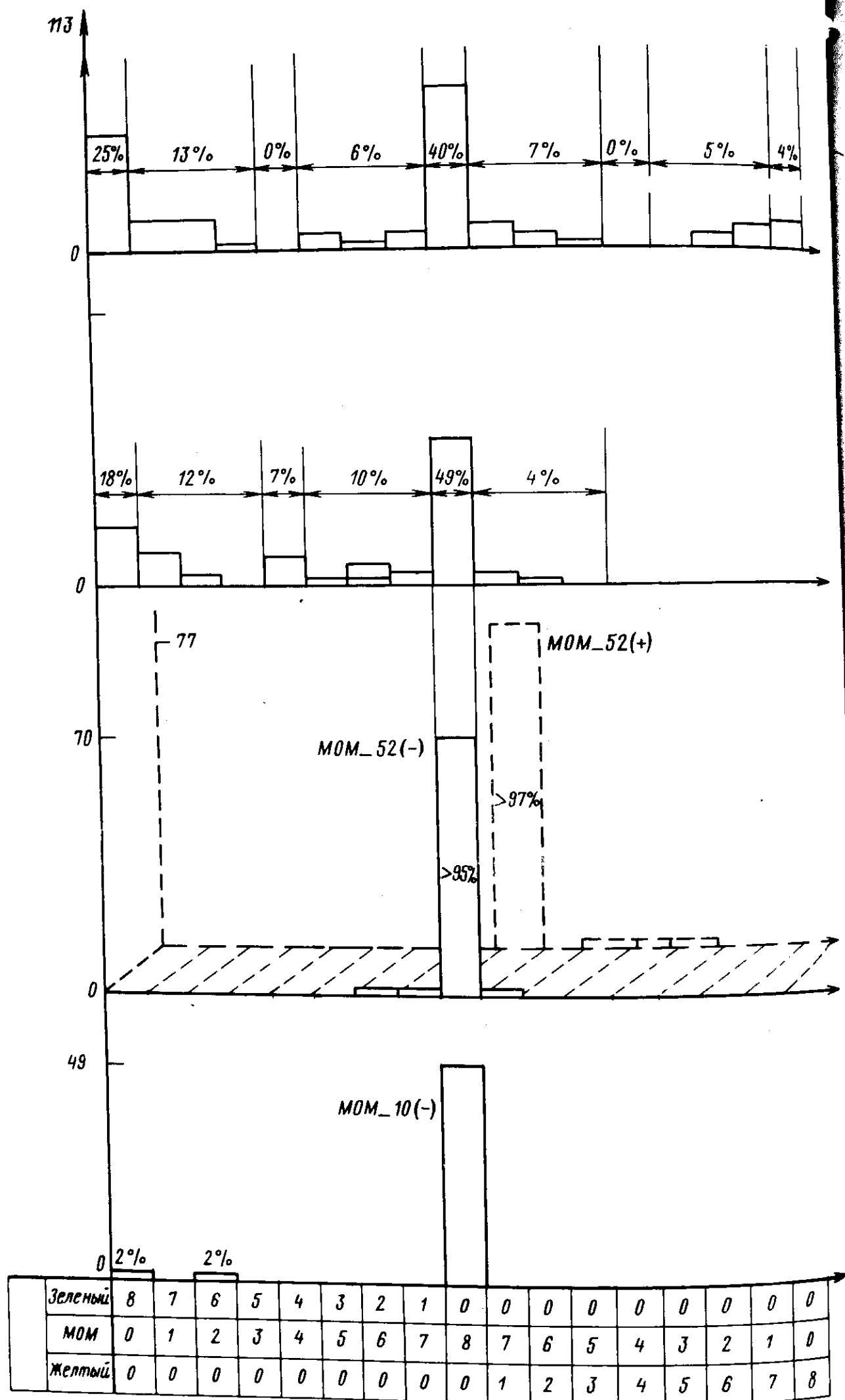
Было проверено некоторое количество одноцветных зеленых и желтых клонов, полученных в ходе анализа педигри. Большая часть зеленых субклонов стабильна: MOM-88(+) 96%(49/51), MOM-35(+) 92%(99/107). Все зеленые субклоны MOM-10 и MOM-52 стабильны, в то время как 35 из 40 желтых субклонов нестабильны уже в первом пересеве. В течение двух лет отбора желтых клонов не удалось выделить чистые желтые субклоны в ходе вегетативного размножения. Мозаичные и желтые колонии можно рассматривать как два варианта MOM-мутантов, переходящих друг в друга в ходе вегетативного размножения. Появление стабильных зеленых клеток показывает, что действительно имеется соматическое расщепление в ходе митотических делений. Вероятно, акт появления зеленых стабильных клеток может происходить в любом из митозов, что дает разные количества зеленых клеток в популяциях мозаичных колоний, и это отражает различную степень мозаицизма колоний.

На основе данных анализа педигри рассчитывали частоты выщепления зеленых клеток на одну споруляцию, которые равны проценту клеточных потомств с двумя типами субклонов (зеленые и мозаичные), относящихся к общему числу изученных потомств. Эти частоты появления зеленых клеток на одну споруляцию для MOM-88(+), MOM-35(+), MOM-10(-) и MOM-52 равны соответственно:  $25,0 \cdot 10^{-2}$ ;  $35,6 \cdot 10^{-2}$ ;  $2,09 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,36 \cdot 10^{-2}$ .

Соматическое расщепление по пигментации колонии может объясниться различными причинами: 1) мутабельным состоянием ядерного локуса, контролирующего указанные выше признаки пластиды, 2) митотической рекомбинацией в потомстве частичных гетерозигот по этому локусу, 3) внеядерной мутацией. Из этих трех предположений нам кажется более вероятным последнее, ибо мутабельное состояние ядерного локуса, т.е. состояние мозаичности, едва ли можно индуцировать столь часто (до 2, 3% мутаций MOM) и, кроме того, вторичными мутациями в одном или нескольких ядерных локусах трудно объяснить необычно высокие частоты выщепления зеленых клеток (до  $35,6 \cdot 10^{-2}$  на одну споруляцию).

### 3. Мейотическое расщепление нестабильных мутантов

А. Скрещивание с исходными дикими штаммами (+) и (-) типов спаривания. Данные по тетрадному анализу при скрещивании MOM с исходными дикими формами представлены в виде диаграмм на рис. 3. При учете наследования нестабильности фенотипы MOM и желтый (у) рассматривались как один класс MOM. Большинство тетрад имеет расщепление 2 MOM:2 MOM<sup>+</sup>. В отдель-



Соотношение клонов с разной окраской в октадах

ных скрещиваниях число таких тетрад достигает более 90%. Расщепление 2:2 наблюдается как при скрещивании мутантов (+) типа спаривания, так и у мутантов (-) типа, что указывает на двуродительское наследование нестабильности. Полученные данные также показывают, что фактор мозаичности относительно стабильно передается потомству в ходе мейоза. Сэджер сообщила о расщеплении 2 нестаб. : 2 стаб. у нестабильных желтых мутантов хламидомонады и предположила, что нестабильность связана с единичным генетическим фактором (Sager, Tsubo, 1962). В наших экспериментах картина наследования этих мутантов более сложна. Наряду с регулярным расщеплением 2:2 имеется немало тетрад с отклонением от 2 MOM:2 MOM<sup>+</sup>. Встречены следующие типы отклонения от 2 MOM:2 MOM<sup>+</sup>: 4:0 (4%), 3:1 (3,7%), 5:3 (1,8%), 3:5 (0,7%), 1:3 (3,6%), 0:4 (4,8%). Соотношения 7:1 и 1:7 не были встречены. Тетрады 0:4 могут быть результатом скрещивания клеток дикого типа с клетками зеленых сегрегантов, присутствующих в популяции MOM с частотой 1-10%. Часть тетрад 4:0 могла возникнуть в результате скрещивания клеток MOM с нестабильными клетками из популяции дикого штамма (0,5%). Однако количество тетрад с избытком MOM, таких как 4:0, 3:1 и 5:3, намного больше, чем ожидается из состава скрещиваемых популяций, что позволяет предположить или существование не одного, а нескольких факторов, связанных с признаком нестабильности, или внеядерную природу этого фактора и связанную с этим меньшую регулярность наследования.

Появление тетрад с уменьшением числа мозаичных колоний в какой-то мере можно объяснить тем, что во втором делении мейоза и далее происходит выщепление клеток, дающих зеленые клоны. Сравнение количества тетрад 1 MOM:3 MOM<sup>+</sup> (1 из 42) в скрещивании MOM-35(+) x mt (-) с количеством вегетативных октад 4 MOM:4 MOM<sup>+</sup> при анализе педигри (5 из 72) (см. рис. 2) подтверждает вышесказанное.

Б. "Тетеро- и гомоаллельные" сочетания факторов нестабильности. В табл. 2 представлены данные скрещиваний MOM-35 (+) x MOM-52(-), MOM-35(+) x MOM-10(-) и MOM-52(+) x MOM-10(-). Появилось три типа тетрад: 4 MOM:0 MOM<sup>+</sup>, 3 MOM:1 MOM<sup>+</sup> и 2 MOM:2 MOM<sup>+</sup>. Нет сомнения, что тетрады 4 MOM:0 MOM<sup>+</sup> и 3 MOM:1 MOM<sup>+</sup> получены только от скрещивания двух клеток MOM. Расщепление 4 MOM:0 MOM<sup>+</sup> в данном случае можно рассматривать как родительское сочетание 2 MOM<sub>1</sub>:2 MOM<sub>2</sub>. Появление MOM<sup>+</sup> в тетраде 3:1 может быть или результатом рекомбинации генетического материала, или актом возникновения зеленых сегрегантов во втором делении мейоза. Частота тетрад 3:1 в этих скрещиваниях намного выше, чем ожидаемая; поэтому, исходя из данных, полученных при анализе педигри, вероятнее, что большая часть этих тетрад - результат рекомбинации. Полученные данные укладываются в схему дигибридного скрещивания, если считать тетрады 3 MOM:1 MOM<sup>+</sup> тетрадином (T) и 2 MOM:2 MOM<sup>+</sup> неродительским дитипом (N) и 4 MOM:0 MOM<sup>+</sup> родительским типом (P).

Для выяснения поведения факторов нестабильности при гомоаллельных

Рис.2. Митотическое расщепление мутантов MOM.  
Высота диаграммы соответствует числу октад данного класса, доля каждого из наблюдаемых классов указана в процентах.

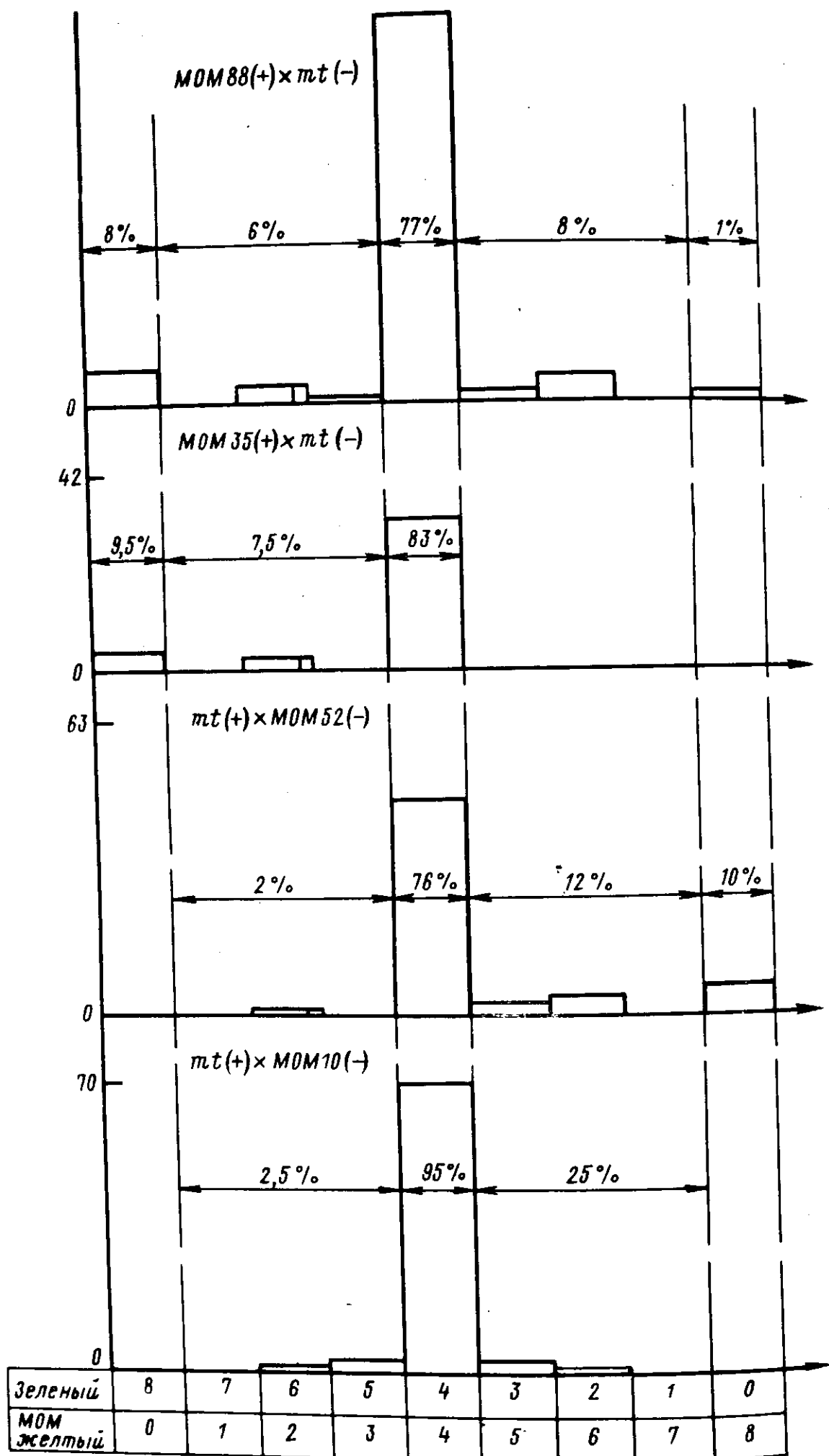


Рис.3. Результаты тетрадного анализа скрещиваний мутантов MOM с дикими штаммами. Обозначения те же, что на рис. 2.



сочетаниях, а также для проверки, действительно ли появление зеленого выщепления  $MOM^+$  (в тетраде 3  $MOM:I MOM^+$ ) при гетероаллельном сочетании связано с рекомбинационным событием, были проведены скрещивания мутантов  $MOM$  на самих себя. Использовали рекомбинанты противоположных типов спаривания из одной и той же тетрады от скрещивания дикого типа с мутантами  $MOM:MOM-35-37(+)$  и  $(-)$ ,  $MOM-52-32(+)$  и  $(-)$  и  $MOM-10(+)$  и  $(-)$ . Поскольку скрещиваемые формы были взяты из одной и той же тетрады, то можно считать, что факторы нестабильности идентичны.

Полученные данные представлены в табл. 2 (строки 5-7). В более чем 60% тетрад проявляется расщепление 4  $MOM:0 MOM^+$ , ожидаемое для сочетания

Т а б л и ц а 2

Характер расщепления при скрещивании нестабильных пигментных мутантов между собой

№	Скрещивание	Колич. тетрад	Типы тетрад				Соответствие с $IP:IN:4T$	
			4 $MOM:0 MOM^+(P)$	2 $MOM:2 MOM^+(N)$	3 $MOM:I MOM^+(T)$	3 $MOM:I$ леталь.	$\chi^2$	P
1	$MOM-35(+)$ x $MOM-52(-)$	39	24	9/0/	3	3	20	0,01
2	$MOM-35Ж(+)$ x $MOM-52Ж(-)$	34	30	1	3	4	20	0,01
3	$MOM-35(+)$ x $MOM-10(-)$	81	33	20/16/	25	3	11,3	0,01
4	$MOM-52-32в(+)$ x $MOM-10(-)$	28	16	5/3/	7	0	9,5	0,01
5	$MOM-35-37(+)$ x $MOM-35-37(-)$	22	12	2	0	8	-	-
6	$MOM-52-32в(+)$ x $MOM-52-32(-)$	56	40	3	3	10	-	-
7	$MOM-10-22(+)$ x $MOM-10-22(-)$	17	11	1	0	5	-	-

гомоаллельных факторов. Тетрады с расщеплением 2  $MOM:2 MOM^+$  объяснимы скрещиванием клеток  $MOM^+$ , присутствующих в популяции гамет, с мутантными клетками. Появление тетрад 3  $MOM:I MOM^+$  трудно объяснить, не привлекая механизм нерцепируемой рекомбинации. В 41 из 123 изученных тетрад из всех трех скрещиваний встречены летальные продукты мейоза, причем в 23 тетрадах наблюдалось соотношение 3  $MOM:I$  леталь, что трудно объяснить, если придерживаться предположения о простом генном детерминанте нестабильности. Отношение 3  $MOM:I$  леталь и 3  $MOM:I MOM^+$  указывает, на наш взгляд, на то, что в гомозиготе по фактору нестабильности могут происходить нерцепируемые рекомбинационные события с довольно высокой частотой, которые приводят к возникновению дикого типа или леталей.

Учитывая, что при гомоаллельных скрещиваниях появилось некоторое количество тетрад 3  $MOM:I MOM^+$ , что часть 2  $MOM:2 MOM^+$  возникла в результате скрещивания клеток  $MOM^+$ , присутствующих в популяции гамет, можно принять, что количество рекомбинантных тетрад N и T типов в действительности еще ниже. Так как во всех гетероаллельных скрещиваниях нет соответствия  $IP:IN:4T$ , можно предполагать сцепление мутаций нестабильности в формальном смысле слова, если рассматривать их как изменения ядерных или аналогичных ядерным факторов.

В. Скрещивание со светочувствительным мутантом N-15( $lts_4$ ). Данные по скрещиваниям MOM-35(+) x N-13(-), MOM-52(-) x 5I-13-123(+), MOM-52(+) x N-13(-) и MOM-10(-) x 5I-13-123(+) представлены в табл. 3. Рекомбинантные

Т а б л и ц а 3

Характер расщепления при скрещивании нестабильных мутантов со светочувствительным мутантом N-13 (MOM  $lts_4^+$  x MOM $^+lts_4$ )

Скрещивание	Колич. тетрад	Типы тетрад			Соответствие с IP:DN: 4T	
		P	N	T	$\chi^2$	p
MOM-35(+) x N-13(-)	30	8	2	20	3,6	0,2 P> >0,05
MOM-52(-) x 5I-13-123(+)	33	12	0	21	13,2	p>0,01
MOM-52(+) x N-13(-)	89	34	5	50	20	p>0,01
MOM-10(-) x 5I-13-123(+)	15	6	1	8	6	p=0,05
	48	13	4	31	6	p=0,05

$$p = 2 \text{ MOM } lts_4^+ : 2 \text{ MOM}^+ lts_4 ;$$

$$N = 2 \text{ MOM}^+ lts_4^+ : 2 \text{ MOM } lts_4 ;$$

$$T = 1 \text{ MOM } lts_4^+ : 1 \text{ MOM}^+ lts_4 : 1 \text{ MOM}^+ lts_4^+ : 1 \text{ MOM } lts_4 .$$

сочетания MOM-35  $lts_4$  и MOM-52  $lts_4$  были летальными в проведенных скрещиваниях. Это говорит о том, что две независимые мутации (MOM-35 и MOM-52) имеют сходное проявление не только по действию на окраску, но и по типу взаимодействия с локусом  $lts_4$ . По соотношению трех типов тетрад и по тому, что тетрады родительского типа преобладают над неродительскими типами, ясно, что факторы нестабильности сцеплены с мутацией светочувствительности  $lts_4$ .

**Обсуждение.** Нестабильность пигментных мутантов хламидомонады передается потомству в ходе митозов и мейозов. Нет сомнения в том, что это изменение генетического материала клетки и что оно воспроизводится в поколениях. Полученные данные гибридологического анализа позволяют предполагать сцепление в формальном смысле слова мутаций MOM-10 и MOM-35, MOM-52, между собой и с мутацией светочувствительности  $lts_4$ . Все эти факторы связаны с функцией фотосинтетического аппарата — хлоропласта. Они наследуются двуродительно, так что их расщепление соответствует поведению хлоропластных ДНК в ходе мейоза. На основе отклонений в характере наследования ранее было высказано предположение о пластидной локализации  $lts_4$  (Столбова, 1971). Высокую частоту встречаемости тетрад с отклонением от 2:2 (4 MOM : 0 MOM $^+$  и 3 MOM : 1 MOM $^+$ ) в скрещиваниях с дикими штаммами можно объяснить меньшей регулярностью расщепления фактора нестабильности, хотя не полностью исключена возможность конверсии ядерных генов с необычно высокой частотой. Высокая частота индукции мутантов MOM в наших опытах не противоречит предположению о хлоропластной локализации этих мутаций.

Характер мейотического расщепления при гомоаллельном скрещивании указывает на сложность детерминации нестабильности. Появление леталей и MOM $^+$  в этих скрещиваниях, вероятно, связано с высокой частотой рекомбинационных событий в этих локусах. Такой локус может существовать в хлоропласте, поскольку была показана многократная повторяемость структуры хлоропластной ДНК, которая в гаметах состоит не меньше чем из 26 идентичных субъ-

единиц, а в вегетативных клетках - не меньше чем из 52 субъединиц (Bastia e.a., 1971).

## В ы в о д ы

1. Нитрозоэтилмочевина индуцирует большое количество нестабильных пигментных мутантов (17 - 18% всех пигментных мутантов); наибольшие средние частоты возникновения у  $mt(+)$  и  $mt(-)$ : соответственно 1,8 и 2,3%.

2. У нестабильных мутантов наблюдается соматическое расщепление с высокой частотой. Акт возникновения зеленых клеток не связан с появлением желтых клеток и может происходить в любом митозе. Частота появления стабильных зеленых клеток на 100 споруляций для MOM-88(+), MOM-35(+), MOM-10(-) и MOM-52 равна соответственно 25,0; 35,6; 2,09 и 1,36.

3. Мейотическое расщепление при скрещивании с дикими штаммами указывает на двуродительское наследование факторов нестабильности с расщеплением 2 MOM : 2 MOM<sup>+</sup> в основной части тетрад.

4. Характер расщепления при гомоаллельном сочетании фактора нестабильности указывает на сложность детерминации нестабильности.

5. Изученные мутации нестабильности MOM-35, MOM-52 и MOM-10 сцеплены между собой и с мутацией светочувствительности  $lts_4$  в формальном смысле слова.

## Summary

The mutational and hybridological analysis of unstable *Chlamydomonas* mutants with mosaic pigmentation of colonies was performed. The unusually high rate of induced mutations of pigment mosaicism (MOM) (1-2%, 18% of all pigment mutants) was recorded after nitrosoethyl urea treatment. Under heterotrophic condition the main part of MOM colonies was yellow and the green spots and sectors were unorderedly distributed on their surface. MOM-character is a genetical trait of this mutants. Only one type of stable subclones were recorded - green ones. The rate of their arising was 25-1,3 per 100 sporulations. The 2:2 segregation of heterozygotes was found with the rare deviations. The three MOM mutations were linked ones with others and with locus  $lts_4$ , mutation of light sensitivity. The probability of plastom location of this mutation was discussed.

## У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

Белецкий Ю. Д., Разорителева Е. К., Жданов Ю. А. Цитоплазматические мутации подсолнечника, индуцированные N-нитроэтилмочевинной: - Докл. АН СССР, 1969, т. 186, № 6, с. 1425.

К в и т к о К. В. Получение культур от отдельных клеток у хлореллы. - В кн.: Исследования по генетике, № I. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1961, с. 50.

С т о л б о в а А. В. Генетический анализ пигментных мутаций *Chlamydomonas reinhardi*. II. Анализ наследования мутаций бесхлорофильности и светочувствительности в скрещиваниях с диким типом. - "Генетика", 1971, т. 7, № II, с. 124.

С т о л б о в а А. В. Генетический анализ пигментных мутаций одноклеточных водорослей. Автореф. канд. дис. Л., 1971, 24 с.

Т е м п е р Э. Е. Мутационная изменчивость *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz, индуцированная N-нитрозометилмочевинной. - "Генетика", 1971, т. 7, № 5, с. 42.

Х р о п о в а В. И. Изменчивость *Chlorella vulgaris* Beijer, индуцированная N-нитрозометилмочевинной. - В кн.: Супермутагены, М., "Наука", 1966, с. 190.

Х р о п о в а В. И. Химический мутагенез как метод изучения агамно-размножающейся одноклеточной водоросли хлореллы. Автореф. канд. дис. Л., 1971, 24 с.

B a s t i a D., C h i a n g K.S., S w i f t H.H. Heterogeneity, complexity and repetition of the chloroplast DNA of *Chl. reinhardi*. - Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1971, v. 68, N 6, p. 1157.

C h i a n g K.S. Replication, transmission and recombination of cytoplasmic DNA's in *Chl. reinhardi*. - In.: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplast. - Amst. Nor. Holl., 1971, p. 235-248.

E b e r s o l d W.T., L e v i n e R.P. A Genetic analysis of linkage group I of *Chl. reinhardi*. - Z. Vererbungslehre, 1959, N 90, p. 74.

L e v i n e R.P., E b e r s o l d W.T. The relation of calcium and magnesium to crossing over in *Chl. reinhardi*. - Z. Vererbungslehre, 1958, N 89, p. 631.

L e v i n e R.P., G o o d e n o u g h U. The genetics of photosynthesis and of the chloroplast in *Chl. reinhardi*. - Ann. Rev. of Genetics, 1970, v. 4, p. 397.

S a g e r R. Mendelian and non-Mendelian inheritance of Streptomycin resistance in *Chl. reinhardi*. - Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1954, v. 40, N 5, p. 356.

S a g e r R. A nonmappable unit factor in *Chlamydomonas*. - "Genetics", 1962, v. 47, N 8, p. 982.

S a g e r R., T s u b o Y. Mutagenic effects of Streptomycin in *Chlamydomonas*. - Arch. Mikrobiol., 1962, v. 42, p. 159.

S a g e r R., R a m a n i s Z. Formal genetic analysis of organelle genetics system. Stadler Symposia, 1971, v. 1 a. 2, p. 65.